

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е. И. Шишацкая

« _____ » _____ 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Применение метода анализа ПДРФ при выявлении разных видов
рода *Bacillus*

Научный руководитель _____ доцент, к.б.н. О. А. Гусейнов

Выпускник _____ С.В. Тонких

Красноярск 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	2
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 ДНК.....	6
1.2 Выделение ДНК.....	7
1.3 Бактерии рода <i>Bacillus</i>	8
1.4 Места обитания бактерий рода <i>Bacillus</i>	10
1.5 Ген 16S рРНК.....	12
1.6 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	13
1.7 Детекция результатов ПЦР.....	16
1.8 Очистка ДНК после реакции амплификации.....	16
1.9 Рестриктивный анализ ДНК.....	17
1.10 Электрофорез.....	21
1.11 Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.....	24
1.12 Негенетические методы идентификации микроорганизмов.....	26
1.13 Биохимическая идентификация микроорганизмов.....	27
1.14 Традиционные методы бактериологического анализа.....	29
1.15 Недостатки традиционных методов бактериологического анализа.....	29
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	30
2. 1 Объекты исследования.....	30
2.2 Методика выделение ДНК.....	30
2.3 Особенности выделения ДНК.....	31
2.4 Методика проведения ПЦР.....	31
2.5 Методика очистки ампликонов.....	33
2.6 Проведение реакции рестрикции.....	33
2.7 Методика проведения электрофореза.....	34
2.8 Методика анализа <i>in silico</i>	36
3 РЕЗУЛЬТАТЫ.....	37
3.1 Проведение анализа <i>in silico</i>	37
3.2 Выделение ДНК из биомассы бактерий.....	38
3.3 Получение ампликонов гена 16S рРНК.....	39
3.4 Проведение реакции рестрикции.....	41
3.5 Сравнение теоретических и практических данных.....	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	52
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	53
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	54

ВВЕДЕНИЕ

Прокариоты – древнейшая группа организмов. Множество подобных микроорганизмов постоянно сопровождают человека на протяжении всей жизни. Человечество применяет их в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве, в медицине, при добыче полезных ископаемых и во многих других сферах жизни. Однако многие прокариоты являются причиной различных заболеваний [1].

Многие виды прокариот имеют похожие характеристики и их трудно различить классическими методами микробиологии, поэтому существует необходимость в современных методах идентификации.

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) является одним из наиболее дешевых и скорых методов идентификации бактерий. Результат можно получить в течение суток. Метод анализа ПДРФ не так чувствителен к примесям в ДНК по сравнению с методами секвенирования.

В данной работе показано использование метода анализа ПДРФ для идентификации микроорганизмов на примере бактерий рода *Bacillus*.

Актуальность работы

Бациллы (*Bacillus*) — многочисленный (более 200 видов) род грамположительных палочковидных бактерий. Большинство бацилл — почвенные микроорганизмы, разрушающие отмершие останки живых существ, превращая их в простейшие соединения. Многие виды данных бактерий проявляют широкий ранг физиологических способностей, позволяющий им расти практически в любых естественных условиях. Бактерии рода *Bacillus* способны к образованию спор, устойчивых к неблагоприятным воздействиям: экстремальным температурам, высушиванию, ионизирующим излучениям, обеззараживающим химическим агентам. Бациллы, а также синтезируемые ими вещества используются в биозащите растений. Они широко используются в генной инженерии при

клонировании ДНК. Преимуществами бацилл, как хозяев для клонирования ДНК является высокая изученность генома многих видов, способность секретировать интактные белки в окружающую среду, нетребовательность большинства видов *Bacillus* к питательной среде, высокая технологичность, а также возможность длительного хранения промышленных штаммов в виде высушенных спор. Данный род бактерий и продукты их жизнедеятельности применяются для создания: биопрепаратов для очистки почв, сточных вод от плохо разлагаемых веществ (нефть, нефтепродукты, тяжелые металлы, пестициды и многие другие загрязнители), противовирусных, противогрибковых препаратов, удобрений. Существуют виды бацилл, вызывающих болезни животных и человека [1, 2].

Поскольку бактерии рода *Bacillus* занимают такое важное место среди бактерий, существует необходимость уметь идентифицировать их отдельные виды.

Цель данной работы: методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов гена 16S-rРНК идентифицировать виды бактерий рода *Bacillus* среди представленных образцов бактерий.

На основании поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Провести анализ ПДРФ *in silico* ампликонов 8F–1492R и 500L–1350R гена 16S-rРНК различных видов бактерий рода *Bacillus* с использованием данных GenBank и построить виртуальные электрофореграммы;
2. Отобрать среди предоставленных образцов микроорганизмов бактерии рода *Bacillus*. Выделить ДНК из биомассы образцов бактерий рода *Bacillus*, определить её концентрацию и качество;
3. С помощью ПЦР получить ампликоны 8F–1492R и 500L–1350R гена 16S - рРНК исследуемых бактерий, подвергнуть ампликоны рестрикции и проанализировать полученные продукты с помощью электрофореза в агарозном геле;

4. Сравнить полученные *in silico* и практически картины электрофоретического разделения рестриктов и определить виды бактерий.

Работа выполнена на кафедре Медицинской биологии в Институте Фундаментальной Биологии и Биотехнологии СФУ.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) - макромолекула, состоящая из повторяющихся нуклеотидов четырёх видов и обеспечивающая хранение, а также передачу генетической информации в организмах из поколения в поколение [3].

ДНК у высших организмов находится в ядре клетки. ДНК бактерий имеет обычно кольцевую структуру и прикреплена изнутри к клеточной мембране [4].

Макромолекула ДНК состоит из двух цепей, ориентированных азотистыми основаниями друг к другу и закручена в виде спирали. В ней содержится всего четыре основания: гуанин, тимин, аденин, цитозин. Эти основания соединяются в двуспиральной цепи друг с другом водородными связями по принципу комплементарности: гуанин с цитозином, аденин с тимином. Эта особенность ДНК позволяет однозначно восстановить последовательность нити, имея на руках ее комплементарную копию. Последовательность нуклеотидов в ДНК позволяет «кодировать» информацию о различных типах РНК, наиболее важными из которых являются информационные (или матричные), рибосомальные и транспортные [5].

Двойная спираль ДНК обычно не взаимодействует с другими сегментами ДНК, и в человеческих клетках разные хромосомы пространственно разделены в ядре. Это расстояние между разными хромосомами важно для способности ДНК действовать в качестве стабильного носителя информации. Рекомбинация позволяет хромосомам обмениваться генетической информацией, в результате этого образуются новые комбинации генов [6].

ДНК играет важную биологическую роль. Она не только передает генетическую информацию, но и участвует во многих процессах, протекающих в клетке [7].

1.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК и РНК — необходимый шаг подготовки проб перед биохимическими и диагностическими процессами. Многие биохимические процессы, такие как амплификация, проведение обратной транскрипции, сиквенс, гибридизация, синтез ДНК, не могут быть выполнены непосредственно на биологических образцах без предварительного выделения и очистки нуклеиновых кислот. Существует несколько общепризнанных методов получения ДНК из биологического материала, и в зависимости от поставленной задачи нужно выбрать наиболее оптимальную методику [8]. При выборе нужно помнить про несколько требований, предъявляемых к конечному результату, например - высокий выход нужного материала; время, требуемое для получения конечного продукта; высокое качество полученного материала.

В литературе описано множество методов, позволяющих выделять нуклеиновые кислоты из разнообразных биологических материалов, однако не все пригодны для автоматизации этого процесса [9]. Методы выделения ДНК можно разделить на жидко - и твердофазные методы.

Жидкофазные методы применяются когда требуется лизис биологического материала (например кровь или ткань) детергентами или хаотропными веществами. После стадии лизиса следует несколько стадий в которых применяют органические растворители (фенол, хлороформ или этанол). При помощи перхлората натрия можно достигнуть полного разделения белков и нуклеиновых кислот. Стандартная методика получения чистого препарата основана на том, что ДНК является полярной молекулой и не растворяется в органических растворителях [10]. Традиционно для

выделения ДНК используется фенол-хлороформная экстракция. При перемешивании клеточного лизата и фенола формируются две фазы. Нуклеиновые кислоты расположены в верхней фазе, а денатурированные протеины — в нижней фазе [11]. В этом способе присутствует несколько стадий центрифугирования и жидкостной экстракции, поэтому данный способ нельзя автоматизировать.

В твердофазных методах выделения нуклеиновых кислот используются следующие процессы и принципы: водородные связи с немодифицированной гидрофильной матрицей; ионообмен в водном растворе; аффинность; механизмы исключения по размеру. Твердофазные системы, поглощающие НК, состоят из кварцевых частиц, стеклянных волокон, анионообменные носителей, применяемые в хроматографических сепарационных колонках [12].

1.3 Бактерии рода *Bacillus*.

Род *Bacillus* — грамположительные аэробные подвижные палочки, размером до 25 мкм. Они образуют овальные эндоспоры. Эндоспоры — это особый тип покоящихся клеток бактерий, формирующихся внутри цитоплазмы материнской клетки. Эндоспоры обладают многослойными белковыми покровами, наружной и внутренней мембранами, кортексом. Кроме того, они устойчивы к высоким температурам, засухе, радиации, летальным в норме для вегетативных клеток [1, 2].

Бактерии рода *Bacillus* вызывают большой интерес микробиологов по причине широкого распространения видов, отличающегося цикла развития и сильной химико-физической устойчивости их спор.

Споры с момента обнаружения были признаны самой устойчивой формой жизни. В состоянии покоя у спор метаболизма нет, и они показывают высокую степень устойчивости к инаktivации различными физико-химическими факторами, включая влажный пар, высушивание, УФ- и гамма-

излучение, вакуум и окислители. Несмотря на консервацию метаболизма, споры остаются способными к непрерывному контролю пищевого состояния их среды и быстро реагируют на поступление подходящих питательных веществ, прорастая и возобновляя вегетативный рост [13]. Покоящиеся споры показывают невообразимую долговечность и могут быть обнаружены практически в любой среде обитания на нашей планете.

В настоящее время бациллы применяются для получения продуктов четырех типов: ферментов, антибиотиков, высокоочищенных биопрепаратов, включая усилители запаха и пищевые добавки, и инсектицидов.

Было исследовано, что микробы рода *Bacillus* являются одной из главенствующих гетеротрофных групп в микробном сообществе озера Байкал. Так же было выявлено, что бациллы распространены в Байкале неравномерно. Пространственное распределение бацилл зависит от экологических загрязнений [2].

Выделенные из пресной воды и донных отложений озера Байкала, бациллы показали высокую биохимическую активность таких энзимов, как протеаза, амилаза, фосфатаза, фосфолипаза.

В ходе исследования было выяснено, что бактерии, выделенные из донных отложений, способны использовать ПАУ в качестве единственного источника углерода и энергии. Так же они способны растворять соединения силициума [14].

Но на данный момент времени нет информации в литературе, которая бы рассказала, как меняются свойства бактерий в зависимости от типа загрязнения морской воды, что и представляет огромный интерес для изучения.

В род *Bacillus* объединены бактерии, характеризующиеся следующими признаками: прямые или почти прямые палочковидные бактерии, размеры которых $0,3 - 2,2 \times 1,2 - 7,0$ мкм. Большинство способно активно двигаться. Жгутики перитрихальные. Образуют термоустойчивые эндоспоры, но не

более одной в клетке-спорангии. Создание спор не сдерживается экспозицией на воздухе. Окраска по Граму положительна (+), даже при окрашивании "молодой" культуры. Практически все виды бацилл - классические хемоорганотрофы. Бациллам не необходимы факторы роста, они могут даже использовать минеральные формы азота в качестве единственного источника питания. Метаболизм бывает дыхательный, бродильный и дыхательный и бродильный одновременно при использовании разных субстратов. Конечным акцептором электронов в дыхательной цепи является молекулярный кислород, но для некоторых видов может являться нитрат. Большинство видов образует каталазу. Они являются облигатными аэробами. Содержание GC-пар в ДНК исследованных видов варьирует от 30 до 60 % [2, 15].

1.4 Места обитания бактерий рода *Bacillus*

1. Почва

Основной средой обитания бактерий рода *Bacillus*, является почва. Они были выделены даже из образцов почвы, взятых в местообитаниях с экстремальными условиями - в пустыне и в Антарктике. Обычно разнообразие бактерий в почвах с пониженным содержанием органики достаточно ограничено. В них доминируют *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. cereus*. Однако по мере повышения урожайности почвы многообразие видов увеличивается [16].

2. Морская вода

Бактерии рода *Bacillus* могут составлять до 22% общей численности гетеротрофов морской воды. Хотя имеется информация о еще более высоких цифрах, но в среднем численность *Bacillus* составляет около 10%. Более высокая численность количество бактерий рода *Bacillus* характерна для шельфа, она возрастает с увеличением температуры и глубины и снижается с удалением от берега. Это отражает «вымывание» почвенных бактерий в

море. Береговое происхождение этих бактерий подтверждается выделением лучистых грибов из морских течений, устьев рек, шельфов морей и районов открытого моря [17, 18].

В морской воде преобладают клетки *B. licheniformis*, вторыми по численности идут клетки *B. subtilis* и, в незагрязненных образцах, *B. pumilus*. К видам, встречающимся иногда и в основном в чистых районах, относятся *B. brevis*, *B. firmus* и *B. sphaericus*.

3. Пресная вода

Бактерии рода *Bacillus*, обнаруживаемые в пресной воде, в основном имеют почвенное происхождение. Они встречаются чаще всего в метеорологических осадках и представляют собой характерные для почв микроорганизмы (*B. megaterium*, *B. cereus*, *B. firmus* и *B. pumilus*) [19].

Частный интерес представляют термофильные бактерии, выделенные из горячих источников и других термальных вод. К ним относятся *B. acidocaldarius*, *B. stearothermophilus*, «*B. thermodenitrificans*», *B. coagulans* и «*B. thermocatenulatus*» [20, 21].

4. Животные и человек

За исключением бациллы сибирской язвы, *Bacillus* не обладают патогенностью для животных. *Bacillus cereus* вызывает ряд оппортунистических инфекций - чаще всего мастит у коров, образование нарывов, септицемию, эндокардиты, а также ушные и глазные инфекции [22].

Самое распространенное заболевание, вызываемое *B. cereus* – пищевая токсикоинфекция, связанное с потреблением пищи, в котором размножились штаммы данного микроорганизма. *B. cereus* выделяют 2 токсина - рвотный и диаррейный, вызывающие аналогичные симптомы заболевания [23].

Bacillus - важные симбионты жвачных животных, проживающими в рубце. Выделенные штаммы идентифицируемые, как *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. laterosporus*, , способны расщеплять гемицеллюлозу

и играют значительную роль в питании жвачных животных [24, 25]. Кроме того, клетки *B. macerans* принимают участие в фиксации азота в рубце [26].

1.5 Ген 16S рРНК

Недавно начался глобальный пересмотр старой, фенотипической, классификации бактерий, основанной на плохо формализуемых критериях — от внешнего вида колоний до способности окрашиваться специфическими красителями. Новая систематика опирается на молекулярные критерии, в частности, на анализе 16S рРНК, и только отчасти повторяет старую классификацию [27].

Идеальным маркером для идентификации микроорганизмов оказался ген, кодирующий 16S рибосомальную РНК [28].

Основной прорыв в определении эволюции и филогении прокариот связан с введением анализа последовательности амплифицированного гена 16S РНК. Ген 16S рРНК повсеместно распространен и высоко консервативен, имеется в геноме всех известных бактерий и архей, но отсутствует у вирусов и в ядерных хромосомах эукариот [29]. Однако, ген 16S рРНК есть в эукариотах в митохондриальной ДНК. Благодаря консервативным участкам гена, он широко используется для идентификации патогенных бактерий [30, 31].

Консервативные участки можно использовать для первого этапа полимеразной цепной реакции — присоединения праймеров к исследуемой нити ДНК, а видоспецифичные — для определения видов. Степень схожести видоспецифичных участков очень хорошо отражает эволюционное родство разных видов [31].

Последовательности гена 16S-рРНК известны для большого количества бактерий и представлены в свободном доступе в генетических базах данных, таких как GenBank. Это позволяет сравнивать полученные последовательности с уже имеющимися, и тем самым идентифицировать микроорганизмы [32].

1.6 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - это реакция амплифицирования ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы, она включает несколько циклов, где продукты, произведенные в предыдущем цикле, служат матрицей в последующем [33].

При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце [33].

Этот метод был изобретен американским биохимиком Кэрри Муллисом в 1983 году [34], за разработанный метод он получил Нобелевскую премию в 1993 году [35].

Помимо амплификации ДНК, ПЦР позволяет производить множество разных манипуляций с нуклеиновыми кислотами (сращивание фрагментов ДНК, введение мутаций), широко используется в медицинской и биологической практике, например, для диагностики заболеваний (инфекционных и наследственных); клонирования генов, установления отцовства и выявления новых генов [36]. Этот метод эффективен для изучения полиморфизма ДНК.

В основе метода ПЦР лежит природный процесс - комплементарное достраивание ДНК матрицы, которое осуществляется с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция называется репликацией ДНК.

ПЦР - искусственный процесс многократной амплификации специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro* [37].

Для проведения ПЦР требуются следующие компоненты:

- **ДНК-матрица** - содержит участок, который требуется амплифицировать. Для ПЦР в качестве матрицы часто используется вся геномная ДНК [38].

- **Праймеры** - это короткие (10—20 нуклеотидов) одноцепочечные последовательности ДНК, комплементарные определенному участку ДНК.

На первом этапе подбираются два праймера таким образом, чтобы они с двух сторон ограничивали выбранный для анализа ген или его фрагмент. При этом один праймер (forward — прямой, обозначается буквой F) комплементарен участку на одной цепи ДНК, а другой (reverse — обратный, R) — участку на другой цепи [38].

Важнейшая характеристика праймеров — температура плавления (T_m) комплекса праймер-матрица, при которой половина ДНК-матриц образует комплекс с праймером. Усредненная формула подсчета T_m :

$$Tm = 77,1 + 11,7 \lg[K^+1] + \frac{41(G + C) - 528}{L} = 0,75[\%DMSO]$$

где L — количество нуклеотидов в праймере, K^+ — молярная концентрация ионов калия, G+C — сумма всех гуанинов и цитозинов [38].

- **Термостабильная ДНК-полимераза** – фермент катализирующий реакцию полимеризации ДНК согласно принципу комплементарности. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов: *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза), *Thermus thermophilus* (Tth-полимераза) и другие.

- **Дезоксинуклеозидтрифосфаты** (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) - «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.)

- **Ионы Mg^{2+}** - необходимы для работы полимеразы. При нейтрализации отрицательного заряда нуклеотидов, они повышают их реакционную способность. Оптимальная концентрация магния колеблется в пределах 1-5мМ [38].

- **Буферный раствор** - включает в себя смесь анионов и катионов в определенной концентрации и стабильное значение pH. Обеспечивает необходимые условия реакции - pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин. Обычно в его состав входят Tris-HCl (обеспечивает стабильность pH раствора), ПАВ (предотвращают «прилипание» ДНК к стенкам пробирки, стабилизируют фермент), минеральные соли (обеспечивают необходимую ионную силу раствора) [38].

- **Анализируемый образец** - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, содержащий искомую ДНК. При отсутствии ДНК-мишени не образуется специфический продукт амплификации [39].

Обычно при проведении ПЦР выполняется 20—35 циклов, каждый из которых состоит из трех стадий:

1. Денатурация

Двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94—96° С в течение 0,5—2 мин., чтобы цепи ДНК разошлись. На этой стадии разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК. Перед первым циклом проводят длительный прогрев реакционной смеси в течение 2—5 мин для полной денатурации матрицы и праймеров [38].

2. Отжиг

После расхождения цепей, температуру понижают, чтобы праймеры могли связаться с одноцепочечной матрицей. Неправильный выбор температуры отжига приводит либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной температуре), либо к плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре). Температура отжига подбираем в зависимости от состава праймеров и обычно на 4—5°С ниже их температуры плавления. Время стадии— 0,5—2 мин [38].

3. Элонгация

На этой стадии ДНК-полимераза реплицирует матричную цепь, используя праймер в качестве затравки. Полимераза начинает синтез второй цепи от 3'-

конца праймера, который связался с матрицей, и движется вдоль матрицы в направлении от 3' к 5'.

Температура элонгации зависит от полимеразы. Часто используемые полимеразы Taq и Pfu наиболее активны при 72 °С. Обычно время элонгации принимают равным одной минуте на каждую тысячу пар оснований

После окончания всех циклов часто проводят дополнительную стадию финальной элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7-10 мин.

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое нагревание и охлаждение пробирок, с точностью не менее 0,1° С. Ампликон — это единица амплификации [38].

1.7 Детекция результатов ПЦР

На данный момент существует несколько основных способов детекции результатов ПЦР:

- Электрофоретический (в агарозном или полиакриламидном геле)
- ГИФА (гибридизационно — ферментный анализ)
- Гибридизационно — флуоресцентный (флуоресцентная метка)
 - регистрация продукта после окончания реакции амплификации «анализ по конечной точке»;
 - детекция продукта в режиме «реального времени» [40].

1.8 Очистка ДНК после реакции амплификации

Одной из самых важных процедур в молекулярном клонировании является очистка нуклеиновых кислот [41]. Ключевой этап — удаление белков — часто проводят с помощью экстракции водных растворов нуклеиновых кислот фенолом и (или) хлороформом.

Наиболее часто используемый метод концентрирования ДНК – осаждение ее этанолом. Осадок ДНК, образующийся при низкой температуре (-20°C или ниже) в присутствии умеренной концентрации моновалентных катионов, собирают центрифугированием и вновь растворяют в соответствующем буфере, доводя до нужной концентрации. Эта процедура является быстрой и количественной, даже если ДНК присутствует в нанограммах. Для очистки и концентрирования ДНК в последнее время используют хроматографические колонки [41].

1.9 Рестриктный анализ ДНК

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических организмов (бактерии и сине-зеленые водоросли) и некоторых других организмах и выполняющие тем самым "иммунную" функцию [42, 43].

Это ферменты, «узнающие» определенные последовательности (сайты рестрикции) в двухцепочечной ДНК. Их выделяют преимущественно из прокариотических клеток.

В отличие от экзонуклеаз, рестриктазы расщепляют нуклеиновые кислоты не с конца молекулы, а в середине. При этом каждая рестриктаза узнаёт определённый участок ДНК, длиной от четырёх пар нуклеотидов и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне его [44].

К 2016 году выделено более трех тысяч эндонуклеаз рестрикции. Более шестисот рестриктаз доступны в виде коммерческих препаратов и повседневно используются в лабораториях для модификации ДНК и решения генно-инженерных задач [45].

Ферменты рестрикции являются эффективным инструментом исследования. Они позволяют превращать молекулы ДНК очень большого размера в набор фрагментов длиной от нескольких сотен до нескольких

тысяч оснований. С помощью метода электрофореза в агарозном геле. Фрагменты ДНК, различающиеся по размеру, можно легко разделить, а затем исследовать каждый фрагмент отдельно.

Короткие фрагменты мигрируют намного быстрее, чем длинные. При сравнительно высокой концентрации агарозы большие фрагменты вообще не могут проникнуть в гель. В процессе миграции рестрикционные фрагменты не деградируют, их можно вымывать в виде биологически активных двуцепочечных молекул. При окрашивании гелей красителями, связывающимися с ДНК, выявляется набор полос, каждая из которых отвечает рестрикционному фрагменту, молекулярную массу которого можно определить, проведя калибровку с помощью ДНК с известными молекулярными массами [46].

Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем. Основные переменные параметры – это температура инкубации и состав буфера. К температурному режиму предъявляются достаточно жесткие требования, тогда как различия между буферами чаще всего лишь незначительны [46].

Обычно все буферные растворы, используемые для проведения реакций рестриктирования, готовят в виде исходных растворов 10-кратной концентрации, которые можно хранить при 4° С в течение 1-2 недель или при –20° С неопределенно долгое время. Реакционная смесь обычно содержит 0,3 – 1,2 мкг ДНК в объеме 20 мкл или более [47].

Различают 3 класса рестриктаз:

- Рестриктазы первого типа (например, EcoR из *Escherichia coli* K12) узнают определённую последовательность нуклеотидов и разрезают двухцепочную молекулу ДНК неподалёку от этой последовательности в произвольной точке и само место разреза не строго специально.

- Рестриктазы второго типа (например, EcoRI) узнают определённую последовательность и разрезают двойную спираль ДНК в определённой фиксированной точке внутри этой последовательности. Рестриктазы этого типа узнают палиндромальные последовательности, которые обладают центральной осью и считываются одинаково в обе стороны от оси симметрии.
- Рестриктазы третьего промежуточного типа (например, EcoPI) узнают нужную последовательность и разрезают двухцепочную молекулу ДНК, отступив определённое число нуклеотидных пар от её конца (или в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания). При этом образуются фрагменты ДНК либо с ровными (тупыми) концами, либо с выступающими (липкими) 5'- или 3'-концами. Эти рестриктазы узнают асимметричные сайты [44, 48].

В основном используют рестриктазы 2-го типа. Ферменты второго типа состоят из двух отдельных белков: рестрицирующей эндонуклеазы и модифицирующей метилазы. Они нуждаются в ионах магния в качестве кофакторов.

В настоящее время выделено более 500 рестриктаз второго типа, однако среди ферментов, выделенных из различных микроорганизмов, встречаются такие, которые узнают на ДНК одни и те же последовательности. Такие пары или группы называют изошизомерами. Различают истинную изошизомерию (когда ферменты узнают одну и ту же последовательность нуклеотидов и разрезают ДНК в одних и тех же точках) и ложную (когда ферменты, узнавая один и тот же сайт на ДНК, производят разрывы в разных точках в пределах того же сайта) [49].

Большинство рестриктаз второго типа узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощепящие. Мелкощепящие рестриктазы узнают тетрануклеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем

крупнощепящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов [49].

К мелкощепящим рестриктазам относятся Hpa II и Alu (из *Arthrobacter luteus*), к крупнощепящим - Eco RI (из *E. coli*) и Hind III. Если предположить, что сайты узнавания ферментов распределены вдоль цепи ДНК случайно, то мишень для ферментов должна встречаться в среднем 1 раз через каждые 256 п. о., а для энзимов, узнающих 6 нуклеотидов, - через каждые 4096 п. о.. Если сайт узнавания окажется внутри гена, то обработка рестриктазой приведет к его дезактивации. Вероятность такого события значительна при обработке мелкощепящими ферментами и мала при применении крупнощепящих рестриктаз. Поэтому с целью получения целостного гена гидролиз проводят поочередно несколькими крупнощепящими рестриктазами, либо применяют метод "недорестрикции", т.е. происходит расщепление лишь в 1 сайте узнавания [49, 50].

Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем. Основные переменные параметры – это температура инкубации и состав буфера. К температурному режиму предъявляются достаточно жесткие требования, тогда как различия между буферами чаще всего лишь незначительны.

Рестрикционный анализ ДНК широко используется в молекулярно-биологических исследованиях и прикладных работах и является одним из наиболее важных инструментов при изучении ДНК. При помощи эндонуклеаз рестрикции можно провести изучение ДНК различных вирусов, бактерий, животных, растений [51, 52, 53, 54].

Продукты расщепления ДНК обычно анализируются с помощью гель-электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле, а полученная таким образом картина разделения фрагментов ДНК в виде определенного,

отличающегося для разных бактерий, набора полос и является результатом рестрикционного анализа той или иной ДНК [55].

Короткие фрагменты мигрируют быстрее, чем длинные. При сравнительно высокой концентрации агарозы большие фрагменты не могут проникнуть в гель. В процессе миграции рестрикционные фрагменты не деградируют, их можно вымывать в виде биологически активных двухцепочечных молекул. При окрашивании гелей красителями, связывающимися с ДНК, выявляется набор полос, каждая из которых отвечает рестрикционному фрагменту, молекулярную массу которого можно определить, проведя калибровку с помощью ДНК с известными молекулярными массами (маркерами) [44].

При использовании нескольких эндонуклеаз рестрикции для одного образца можно составлять рестрикционные карты. Располагая такой информацией, можно идентифицировать на ДНК биологически важные участки. Поскольку рестрикционная карта отражает расположение определенной последовательности нуклеотидов в данном участке, сравнение таких карт для двух или более родственных генов позволяет оценить гомологию между ними. Анализируя рестрикционные карты, можно сравнивать определенные участки ДНК разных видов животных без определения их нуклеотидной последовательности. Таким образом, было установлено, что хромосомные участки, кодирующие цепи гемоглобина у человека, орангутанга и шимпанзе сохранились в практически неизменном виде в течение последних 5 - 10 млн. лет [46].

Метод рестрикционного картирования позволяет увидеть крупные генетические изменения, такие как делеции или инсерции. При этом происходит уменьшение или увеличение рестрикционных фрагментов, а также исчезновение или возникновение сайтов рестрикции.

1.10 Электрофорез

Электрофорез — это перемещение частиц дисперсной фазы в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля.

Впервые был открыт профессорами Московского университета П. И. Страховым и Ф. Ф. Рейссом в 1809 году [56].

Электрофорез является одним из наиболее важных методов для разделения и анализа компонентов веществ в химии. Этот метод находит широчайшее применение для разделения смесей биомолекул на фракции или индивидуальные вещества. Он используется в биохимии, молекулярной биологии, клинической диагностике, популяционной биологии [57, 58].

В 70-х годах было продемонстрировано, что при помощи электрофореза можно определить длину и чистоту молекул ДНК, а также разделить и отделить нужные фрагменты. Этот метод легок, т. к. каждый нуклеотид в молекуле ДНК обладает отрицательным зарядом, который под действием приложенного электрического поля заставляет молекулы двигаться к аноду. Чтобы разделить молекулы ДНК, исходя из их размера, электрофорез проводят в гелях. Были разработаны специальные гели, с помощью которых удастся разделить фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающиеся всего лишь на несколько нуклеотидов.

Поскольку поры в полиакриламидном геле для больших молекул ДНК слишком малы, то для разделения молекул ДНК по размеру были разработаны агарозные гели (агароза - полисахарид, получаемого из морских водорослей). Все эти методы разделения нуклеиновых кислот часто используются для аналитических и препаративных задач [59].

Агарозный гель-электрофорез – классический метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов нуклеиновых кислот. С помощью этого простого метода можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены любым другим методом [60].

Визуализацию результатов проводится в агарозном геле, который представляет собой застывшую после нагревания в электрофорезном буфере

агарозу в концентрации 1,0-2,5%, с добавлением специфического красителя, например бромистого этидия [61].

Остывшая агароза образует решетку в пространстве. При заливке с помощью гребенок в геле формируют лунки, в которые вносят анализируемые макромолекулы [61].

Пластину геля помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от катода к аноду. При этом более короткие макромолекулы движутся быстрее, чем более большие[61].

Скорость перемещения ДНК через агарозу при гель-электрофорезе определяется следующими пятью главными критериями:

1. Размером макромолекулы;
2. Конформацией ДНК;
3. Концентрацией агарозы;
4. Напряженностью электрического поля;
5. Используемым электрофорезным буфером [62].

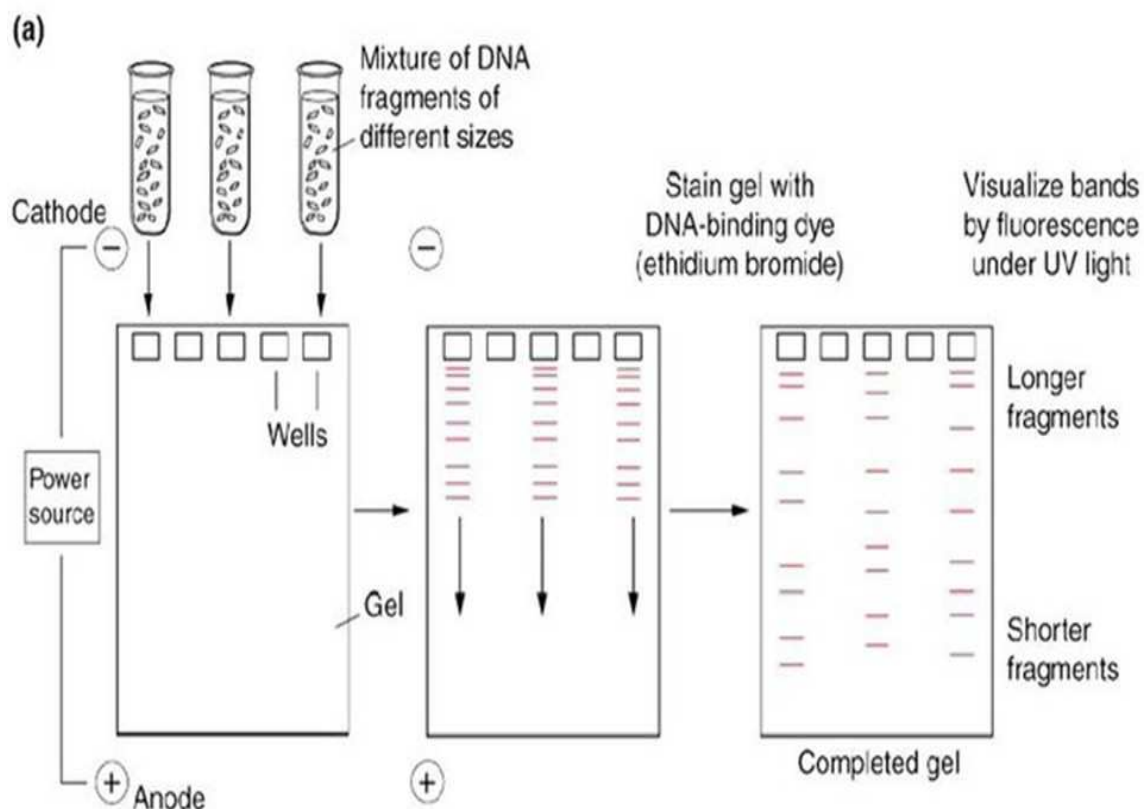


Рисунок 1 – Электрофорез в агарозном геле.

Краситель встраивается группами по всей плоскости молекулы ДНК.

После окончания электрофореза, продолжающегося от 20 мин до 3 часов, гель помещают на фильтр трансллюминирующей установки, которая излучает свет в УФ-диапазоне (250 – 300 нм). Энергия УФ, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого спектра (600 нм) [62].

Бромистый этидий (3,8-диамино-5-этил-6-фенилфенантридиум бромид) — интеркалирующий краситель, часто применяемый в молекулярной биологии, например, для обнаружения молекул ДНК при электрофорезе в агарозном геле [63].

При освещении УФ-светом бромистый этидий светится оранжево-красным цветом. При связывании с нуклеиновой кислотой интенсивность флуоресценции увеличивается примерно в 15 раз.

1.11 Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Традиционный способ идентификации бактерий основан на широком спектре фенотипических характеристик. Организмы разделяли на группы на основе морфологических и физиологических признаков. Эти признаки включают специфические потребности в питании и условиях роста, форму клеток и многое другое. Эти признаки могут быть схожими для многих видов и, следовательно, не иметь уникальную специфичность. У традиционных методов идентификации есть и другие недостатки: идентификация требует проведения большого количества трудоемких тестов, а стандартизация результатов сильно колеблется между лабораториями, что может быть дополнительным источником ошибок. Относительная доступность и простота использования бактериальной генетической информации стала новым шагом в систематике микроорганизмов. Основополагающую роль в этом процессе сыграла расшифровка последовательности генов рРНК. Благодаря своей консервативной природе и простоте манипулирования, ген 16S рРНК широко используется для идентификации видов бактерий [1].

ПДРФ - это способ исследования геномной ДНК, путем разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции [64].

ПДРФ включает следующие этапы: выделение геномной ДНК, ее рестрикцию специфической эндонуклеазой, электрофоретическое разделение образующихся фрагментов ДНК и идентификацию фрагментов ДНК, содержащих полиморфный сайт рестрикции [64].

Полиморфизм ДНК в нашем случае это наличие вариабельности в последовательности нуклеотидов в одном и том же гене (выполняющем те же функции) у близкородственных видов. Он вызывается несколькими причинами: точечными мутациями в виде единичных нуклеотидных замен, ошибками при репликации ДНК в виде инсерций или делеций протяжённостью от одного до сотен или тысяч нуклеотидов, крупными делециями, вставками, транслокациями, транспозициями мобильных

генетических элементов. Все изменения в первичной структуре ДНК ведут к изменениям в длине фрагментов, образующихся под воздействием рестриктаз [64].

В виду того, что технологии секвенирования ДНК могут охарактеризовать ДНК очень точно, ПДРФ был разработан как первый и дешевый метод для массового применения. Анализ разнообразия ПДРФ является важным инструментом в картировании генома, определении генов, ответственных за генетические заболевания, выявлении риска заболевания, получения генетических отпечатков и определения родства. Полное совпадение рестрикционных картин по нескольким рестриктазам указывает на близкородственность данных штаммов [64].

Широко используется в генетических исследованиях популяций, поскольку наличие в геноме исследуемого организма рестрикционного фрагмента ДНК определенной длины является прекрасным генетическим маркером и одновременно фенотипическим признаком, тесно связанным с генотипом организма.

Метод анализа полиморфизма рестрикционных фрагментов успешно используется во многих лабораториях. На нашей кафедре он используется для выявления мутаций в исследованиях [65].

1.12 Негенетические методы идентификации микроорганизмов

Негенетические методы идентификации различных микроорганизмов разрабатывались и совершенствовались учеными на протяжении многих годов, и на сегодняшний день негенетические методы широко используются в науке, фармацевтике, медицине, промышленном производстве, сельском хозяйстве [66].

Идентификации бактерий является одним из самых значительных и трудозатратных этапов проведения бактериологических исследований.

Разработанные ранее методы представляют собой основу для исследователей и являются базисом большого количества методик, которые позволяют определять следующие свойства бактерий [66];

- морфологические (особенности и индивидуальные свойства строения клеток); Морфологическая характеристика микробов включает такие признаки, как форма и размеры клеток, наличие жгутиков и их тип, способность к образованию спор и движению. Примечательным может быть также наличие в клетках различных мембранных систем и органелл (аэросом, карбоксисом, магнетосом, фикобилисом, газовых вакуолей и т.д.), присущих отдельным группам бактерий, а также включений (кристаллы белков и протоксина, гранул волютина, полигид-роксibuтирата, полисахаридов и т.д.). Важное значение для идентификации бактерий придается окрашиванию клеток по Граму, зависящего от типа клеточных стенок [66];
- культуральные (питание, дыхание, условия роста бактериальной культуры). Физиолого-биохимические свойства включают прежде всего установление способа питания исследуемой бактерии (фото / хемо-, авто / гетеротрофия) и типа энергетического метаболизма (способность к брожению, аэробному или анаэробному дыханию или фотосинтезу). Важно определить такие признаки, как отношение бактерии к молекулярному кислороду, температуре, pH среды, солености, освещенности и другим факторам среды. В данную группу признаков входит также перечень субстратов, используемых бактериями в качестве источников углерода, азота и серы, потребность в различных факторах роста, образование характерных продуктов метаболизма, наличие некоторых ферментов. Для этого используют специальные тесты [66];
- ферментативные (биохимические свойства, связанные со способностью бактериальной культуры расщеплять сахара, белки, разрушать эритроциты);

- антигенные (свойства, связанные с особенностями антигенов чистой бактериальной культуры).

Разработанные методы идентификации микроорганизмов делят на рутинные и современные. Предпочтение отдается методам идентификации, которые выполняются за относительно короткий срок (часы) и отличаются высокой степенью объективности и точности [66].

1.13 Биохимическая идентификация микроорганизмов

Биохимическая идентификация вида микроорганизма основывается на определении специфичных ферментов микроба. Присутствие энзима определяют по их способности взаимодействовать с соответствующими субстратами, для биохимической идентификации необходимо 18 – 24 часа. В последнее время появилась возможность определять непосредственно сам фермент, для его определения требуется уже гораздо меньше времени (4 – 6 часов) [67].

Согласно международной биохимической классификации ферментов, в зависимости от катализируемой реакции выделяют 6 основных классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы. Каждый фермент имеет свое систематическое и тривиальное название, а также четырехуровневый числовой код, который указывает на принадлежность фермента к классу, подклассу, под-подклассу и серийный номер фермента в под-подклассе [67].

Тривиальные названия ферментов зависят от субстратной специфичности. Традиционно они классифицируются на сахаролитические, протеолитические, липолитические, окислительно-восстановительные ферменты, а также токсины [67].

Биохимическая идентификация видов бактерий осуществляется с помощью дифференциально-диагностических сред. Эти среды содержат субстрат для какого-либо фермента, характерного для данного

микроорганизма, и индикатор, определяющий изменение pH питательной среды и окрашивающий ее в цвета, характерные для кислых или щелочных значений pH (рис. 2) [67].

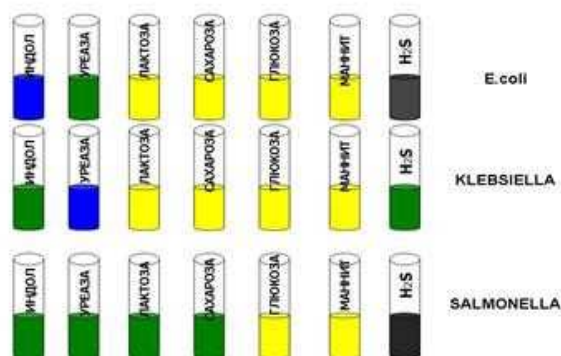


Рисунок 2 — Пример биохимической активности представителей семейства *Enterobacteriaceae*. В среды добавлен индикатор - бромфеноловый синий, при нейтральных значениях pH среда имеет зеленый цвет, при кислых значениях - жёлтый, при щелочных значениях pH - синий. Положительная проба на сернистый водород сопровождается почернением среды.

1.14 Традиционные методы бактериологического анализа

Включают три основных этапа:

1. Посев исследуемого материала на чашки с дифференциально-диагностическими средами;
2. Снятие отдельных колоний и накопление чистой культуры с первичной дифференциацией на комбинированных питательных средах;
3. Полная идентификация выделенной культуры по комплексу биохимических признаков, антигенной структуре, патогенности, устойчивости к специфическим бактериофагам и антибиотикам.

Время проведения микробиологического анализа обычно составляет от 72 часов до 4-5 суток. Такие сроки не удовлетворяют эпидемиологов. Особенно в виду появления новых, очень опасных заболеваний, таких как, например, лихорадка Эбола.

1.15 Недостатки традиционных методов бактериологического анализа

- Требуется много времени на идентификацию микроорганизмов;
- Затрачиваются значительные материальные ресурсы;
- Некультивируемые бактерии не определяются.

В связи с вышеизложенными причинами существует необходимость использовать более современные и быстрые способы диагностики. В качестве эффективного метода идентификации в лабораторной диагностике для определения микроорганизмов все чаще применяются методики, основанные на применении ПЦР.

Универсальность, высокая чувствительность и относительная простота исполнения сделали ПЦР незаменимой для решения таких задач диагностики, как прямое обнаружение и идентификация микроорганизмов, анализ мутаций, связанных с генетическими заболеваниями у человека и идентификация личности человека.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Образцы биомассы бактерий были представлены Ольгой Кондратенко, магистрантом кафедры биотехнологии.

2.2 Методика выделения ДНК

Выделение бактериальной геномной ДНК проводили при помощи набора AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (производства KHP). Методика выделения основана на эффективном выходе геномной ДНК посредством специального лизисного буфера GA (лизисный буфер). После этого быстрое отделение геномной ДНК от протеинов, полисахаридов и липидов достигается уникальным фазоразделительным шагом при добавлении буфера DV. Высокоочищенная геномная ДНК находится в

нижней фазе. Затем нижнюю фазу с растворённой в ней ДНК наносят на фильтр и центрифугируют. На фильтре оседают оставшиеся белки, липиды и полисахариды, а также клеточные стенки бактерий. Следующим шагом раствор ДНК наносят на колонку, где ДНК связывается с ней благодаря буферу BV (ДНК связывающий буфер). Центрифугируют один раз после добавления промывочного буфера W1 и два раза после добавления буфера W2. Центрифугируют 2 минуты при 12000 оборотах. Это делают для того чтобы очистить ДНК от нежелательных молекул и солей, которые могли пройти через фильтр. Очищенная бактериальная ДНК вымывается с колонки элюентом или дистиллированной водой [68].

Хранить препараты ДНК рекомендуется при температуре 2-8 не более 2 недель или до 6 месяцев при -18 не допуская частого замораживания-оттаивания.

2.3 Особенности выделения ДНК

ДНК может быть выделена, как и из грамотрицательных, и грамположительных бактериальных штаммов. При выделении ДНК из грамположительных бактерий необходимо инкубировать при 37 °С в течение 30 минут против 5 минут для грамотрицательных бактерий после добавления лизоцима. Выделение ДНК из грамположительных бактерий требует большего времени обработки лизоцимом [1].

Грамположительные бактерии — это те бактерии, которые, сохраняют окраску после промывания при использовании метода окрашивания бактерий по Граму [1].

2.4 Методика проведения ПЦР

Реакция ПЦР проводилась в приборе ThermalCycler C1000.

На одну пробу объемом 50мкл требуется:

- 27 мкл дист. воды
- 5 мкл 10х буфера
- 5 мкл праймеров с концентрациями по 1μM (500L-1350R или 8L-1492R)
- 3 мкл MgCl₂с концентрацией 2.5mM

Все вещества смешивали в 1 пробирке объемом 1,5 мл из расчета на 15 проб, затем в каждую было добавлено по 47 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК. После горячего старта в каждую из пробирок добавили по 1 мкл ДНК Tag – полимеразы [60].

Ход реакции:

Проведение ПЦР – процесс сложный и занимает приблизительно 25-30 циклов. Каждый из циклов состоит из трех стадий. Это нужно для получения достаточного количества копий искомого характеристического фрагмента ДНК.

1. Горячий старт – одна из первых стадий. ДНК нагревают до 96°C в течение трех минут. Затем температуру понижают до 72°C, чтобы добавить фермент. Далее фермент нет необходимости добавлять, поскольку ДНК-полимеразу изготавливают из термофильных бактерий. Поэтому она термостабильная и способна выдерживать высокие температуры [60].

2. Денатурация. На этой стадии происходит расплетение нитей ДНК под действием на нее высокой температуры- 95 °C. Длительность – две минуты.

3. Отжиг. Здесь происходит присоединение праймеров с соответствующими последовательностям на противоположных цепях ДНК. Температура составляет 57°C (подобрана экспериментальным путем), длительность – 20 секунд [60].

4. Синтез (элонгация). Синтез производится при температуре приблизительно 72°C. Температура зависит от размера куска ДНК и от используемой полимеразы. После синтеза идет повтор циклов.

5.Финальная элонгация. Используется для окончательного достраивания всех одноцепочечных фрагментов. На все это уходит 7-10 минут.

6. Хранение возможно при температуре 4°C в течение 18 часов

Используемая программа при проведении ПЦР:

1. 95°C – 2 мин;
2. 80°C – 2 мин;
3. 95°C – 0:10 сек;
4. 64°C – 0:15 сек;
5. 72°C - 1:00 мин;
6. GO TO 3 35 times;
7. 72°C – 4:00;
8. 4°C – 18:00:00ч;
9. END.

Для визуализации результатов амплификации использовали электрофорез. После окончания электрофореза гель помещали в транслюминатор гель-документирующей системы. Проведенный электрофорез ампликонов ДНК показал, что реакция ПЦР прошла успешно и мы смогли выделить участки ДНК гена 16S рРНК длиной 900 и 1500 пар оснований [60].

2.5 Методика очистки ампликонов

Очистка ампликонов производилась с помощью набора Diatom DNA Clean-UP, производство фирмы IsoGene [69].

Очистка ампликонов с использованием набора реагентов DiatomDNA Clean-UP основана на использовании солюбилизирующего реагента (в соотношении пробы к солюбилизируемому реагенту), в присутствии которого ДНК сорбируется на поверхности Nucleos сорбента. Количество добавляемого сорбента зависит от количества ДНК в пробе (обычно

соотношение 1:2). Время сорбции составляет 5-7 минут с последующей отмывкой спиртовым раствором (этанол). Таким образом ДНК полностью очищается от сопутствующих примесей: избытка праймеров, димеров-праймеров, dNTP, с дальнейшей элюацией с сорбента бидистиллированной водой. Очищенная таким методом ДНК может быть использована для дальнейшей рестрикции и секвенирования [60]. Данный набор обеспечил высокую чистоту очищенной ДНК – OD 260/280 – 1.8-2.0 и особенно эффективен при очистке ДНК размером от 200 до 20 000 п.н.

2.6 Проведение реакции рестрикции

Реакцию рестрикции амплифицированной ДНК проводили в течение 2 ч. в приборе Thermomixercomfort производство фирмы Eppendorf. Реакция проходила в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 2 ед. акт. рестриктазы [60].

Постановка реакции рестрикции, для 1 пробы объемом 50 мкл необходимо:

- 5 мкл 10х буфера
- 10 мкл разб. BSA
- 25 мкл H₂O
- 10 мкл ДНК
- 5 мкл фермента(активность фермента 10 000 е.а/мл)

Все вещества смешали на холоде в 1 пробирке объемом 2 мл, из расчета на 15 проб, затем в каждую пробирку добавили по 35 мкл данной смеси и по 15 мкл исследуемой ДНК [60].

Для визуализации результатов рестрикции использовали электрофорез.

Все использованные нами рестриктазы имеют тетрануклеотидный сайт узнавания, что позволило получить от 3 до 7 фрагментов ДНК в результате расщепления продуктов амплификации, имеющих длины порядка 900 п.о.

2.7 Методика проведения электрофореза

Для анализа ПЦР-амплифицированной ДНК используют разные методы, наиболее простым из которых является гель-электрофорез.

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами. Кроме того, при разделении в геле прямо следят за положением ДНК, так как полосы нуклеиновых кислот в геле можно окрашивать специальным красителем – бромистым этидием. Просматривая прокрашенный гель в УФ-свете, можно заметить даже 0,9 нг ДНК [60].

Оборудование для проведения и документирования электрофореза:

1. Источник питания Bio-Rad PowerPac HV (1-400 Вт, 0,01-500мА, 20-5000В).
2. Камера для горизонтального электрофореза (гель 7x10) Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad.
3. Гель - документирующая система Bio-Rad Gel Doc XR с компьютером [60].

Реактивы:

- 0,85 г агарозы для получения 1,7% геля
- 50 мл электрофорезного буфера TBE
- ДНК Маркеры
- Буфер для нанесения пробы
- Бромистый этидий
- Образцы ДНК
- Вода

Агарозу смешивали с буфером для электрофореза, полученную смесь нагревали и кипятили 1 минуту в СВЧ-печи пока не образовалась равномерная суспензия. Полученную суспензию охлаждали до 60°C. В форму для агарозы заранее была установлена гребенка куда после остывания была залита охлажденная суспензия. Форму с гелем оставляли на 30 минут для застывания. Пока гель застывал необходимые пробы ДНК, и праймеры смешивали в отдельном планшете. После того как гель затвердел, гребенка аккуратно извлекалась и подложку с гелем перемещали в электрофорезную кювету. Необходимо следить за тем, чтобы сторона геля с лунками куда будут вноситься пробы ДНК была со стороны анода. В лунки помещались пробы ДНК и по бокам ДНК Маркеры. После добавления проб гель заливали электрофорезным буфером, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1-2 мм. Электрофорезную камеру закрывали и присоединяли электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении электрофореза составила 80V в течении 2-х часов. По окончании разделения подложку с гелем вынимали и помещали в красящий раствор бромистого этидия (1 мкг/мл). После 30 мин. прокрашивания подложку вместе с гелем промывали в дистиллированной воде в течение 2 минут. Далее гель помещали в трансиллюминатор гель-документирующей системы и рассмотрела гель в проходящем ультрафиолетовом свете [60].

2.8 Методика анализа *in silico*

In silico – термин, обозначающий компьютерное моделирование эксперимента, чаще биологического.

С помощью компьютерного моделирования анализируют нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности, производят выравнивание последовательностей, поиск гомологичных последовательностей ДНК, РНК и белков, построение филогенетических карт, используя специальное программное обеспечение. Осуществляют такие методы как: теоретические

амплификацию, рестриктирование, электрофорез. Данный метод позволяет анализировать различные геномы, имеющие длину до нескольких миллиардов пар нуклеотидов, за короткое время, осуществлять поиск нужных последовательностей ДНК, РНК, белков и работать с ними [70].

Был проведен рестрикционный анализ *in silico* ампликонов их генов 16S-рРНК с помощью программы pDRAW32. После теоретического рестриктирования ампликонов последовательностей 500L – 1350R и 8F-1492R взятых из базы данных GenBank [71] для каждого вида были построены рестрикционные профили. GenBank.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

Из текста выпускной квалификационной работы изъяты результаты интеллектуальной деятельности, которые имеют потенциальную коммерческую научную ценность в силу неизвестности их третьим лицам.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BSA - бычий сывороточный альбумин

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

pPHK – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

п.о. - пары оснований

dATP – дезоксиаденозин трифосфат

dGTP – дезоксигуанозин трифосфат

dCTP – дезоксицитидин трифосфат

dTTP – дезокситимидин трифосфат

dNTPs – дезоксинуклеозид трифосфаты

Оз. - озеро

ПАУ - полициклические ароматические углеводороды

УФ - ультрафиолетовое излучение

НК - нуклеиновые кислоты

E. coli - *Escherichia coli*

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Прудникова, С. В. Микробиология с основами вирусологии : конспект лекций / С. В. Прудникова. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 152 с.
2. Бациллы [Электронный ресурс]: база данных - Режим доступа: <http://dic.academic.ru/dic.nsf/ruwiki/103921>
3. Панчин, А. Ю. Сумма биотехнологии / А. Ю. Панчин. – Москва : АСТ, 2015. – 432 с.
4. Николаев, А. Я. Биологическая химия: учебное пособие / А. Я. Николаев. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2007. – 589 с.
5. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Д. Пастернак – Москва: Мир, 2002. – 589 с.
6. Cremer, T. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells / T. Cremer, C. Cremer // Nat Rev Genet. –2001. – № 2. – P. 292–301.
7. Льюин, Б. Гены / Б. Льюин - Москва: Мир, 1987. - 1064 с.
8. Copeland, W. C. Mitochondrial DNA Methods and Protocols / W. C. Copeland // MMB. - 2002. V. 197. - P. 199-212.
9. Moss, D. An Easily Automated, Closed-Tube Forensic DNA Extraction Procedure Using a Thermostable Proteinase / D. Moss, S. A. Harbison, D. J. Saul // Int. J. Legal Med. - 2003. - V. 117. - P. 340–349.
10. Rapley, R. The Nucleic Acid Protocols Handbook / R. Rapley // University of Hertfordshire. - 2000. - P. 3-9.
11. Chachaty, E. Isolating Chromosomal DNA from Bacteria / E. Chachaty, P. Saulnier. // The Nucleic Acid Protocols Handbook. - 2000. - P. 29-32.
12. Teeters, M. A. Adsorptive Membrane Chromatography for Purification of Plasmid DNA / M. A. Teeters, S. E. Conrardy, B. L. Thomas // J. Chromatography. - 2003. - V. 989. - P. 165–173.

13. Nicholson, W. L. Resistance of *Bacillus* Terrestrial and Extraterrestrial Environments / W. L. Nicholson [et al] // Microbiology and Molecular biology reviews. - 2000. - V. 64. - № 3. - P. 584-572.
14. Суслowa, М. Ю. Распространение и разнообразие спорообразующих бактерий рода *Bacillus* в водных экосистемах: дис... канд. биол. наук: 03.00.16, 03.00.07 / М. Ю. Суслowa ; Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Лимнол. ин-т. - Улан-Удэ, 2007. – 163 с.
15. Краткий определитель бактерий Берджи: [под ред. Дж. Хоулт]: [пер. с англ.] / Под ред. чл.-кор. АН СССР Г. А. Заварзина. - Изд. 7-е, - Москва: Мир, 1980. – 495 с.
16. Goodfellow, M. Delineation and description of microbial populations using numerical methods, in: Computer Assisted Bacterial Systematics / M. Goodfellow, C. H. Dickinson // Academic Press. - Orlando. - 1985. - P. 166-226.
17. Cross, T. Aquatic actinomycetes: A critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats / T. Cross // J. Appl. Bacteriol. - 1981. - № 50. - P. 597-424.
18. Attwell, R. W. Thermoactinomyces as terrestrial indicators for estuarine and marine waters, in: Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes / R. W. Attwell, R. R. Colwell // Academic Press. - London. - 1984. - P. 453-372.
19. Allen, D. A. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a freshwater fishery / D. A. Allen [et al] // J Gen. Microbiol. - 1983. - № 129. - P. 2043-2062.
20. Головачева, Р. С. Новый вид термофильных бацилл – *Bacillus thermocatenuatus* nov. sp. / Р. С. Головачева, Л. Г. Логинова, Т. А. Салихов, А. А. Колесников, Г. Н. Зайцева // Микробиология. - 1975. Т. XLIV, № 2. - С. 265- 268.
21. Wolf, J. Taxonomic and related aspects of thermophiles within the genus *Bacillus*, in: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification

- and Identification / J. Wolf [et al] // Academic Press. - London. - 1981. - P. 251-296.
22. Gilbert, R. *Bacillus cereus* and other *Bacillus species*: Their part in food poisoning and other clinical infections, in: The Aerobic Endospore-Forming Bacteria: Classification and Identification / R. Gilbert [et al] // Academic Press. - London. - 1981. - P. 207-314.
23. Logan, N. A. Distinction between emetic and other strains of *Bacillus cereus* using the API system and numerical methods / N. A. Logan [et al] // FEMS Microbiol. Lett. - 1979. - № 5. - P. 373-375.
24. Williams, A. G. Hemicellulose degrading enzymes synthesized by rumen bacteria / A. G. Williams, S. E. Withers // J. Appl. Bacteriol. - 1981. - № 51. - P. 375-385.
25. Williams, A. G. *Bacillus* sp. in the rumen ecosystem. Hemicellulose depolymerases and glycoside hydrolases of *Bacillus* sp. and rumen isolates grown under anaerobic conditions / A. G. Williams, S. E. Withers // J. Appl. Bacteriol. - 1983. - № 55. - P. 283-292.
26. Jones, K. Nitrogen fixation by the rumen contents of sheep / K. Jones, J. G. Thomas // J. Gen. Microbiol. - 1974. - № 85. - P. 97-101.
27. Woese, C. R. Bacterial evolution / C. R. Woese // Microbiol. Rev. – 1987. – V.51. – P. 221–271.
28. Жимулев, И. Ф. Общая и молекулярная генетика / И. Ф. Жимулев. - Новосибирск : Сибирское университетское издательство, 2003. - 480 с.
29. Woese, C. R. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA / , C. R. Woese, G. E. Fox, L. Zablen // Nature. – 1975. V. 254. – P.83–86.
30. Патрушев, Л. И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. - Москва : Наука, 2004. - 530 с.
31. Колтовая, Н. А. Практикум по молекулярной биологии / Н. А. Колтовая. - Москва : Наука, 2010. - 31 с.
32. National Center for Biotechnology Information – [Электронный ресурс] : режим доступа <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

33. ПЦР [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://bigenc.ru/biology/text/3153433>
34. Ребриков, Д. В. ПЦР в реальном времени: учебник / Д. В. Ребриков, Д. В. Саматов, Д. Ю. Трофимов. - Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.
35. Паренков, А. Д. Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 2. Методы молекулярной диагностики: учебно-методическое пособие / А.Д. Перенков [и др.] – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. И.Н. Лобачевского, 2015. – 44 с.
36. Гусейнов, О. А. Методы биохимических исследований : учеб. метод. пособие к лаб. занятиям / О. А. Гусейнов. - Красноярск: СФУ, 2012. – 46 с.
37. Проведение ПЦР [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://bio.sfu-kras.ru/files/1901_SD.F.11__MY_LR_Metodi_biohimicheskikh_issledovaniy_BH_20_09.doc
38. Полимеразная цепная реакция [Электронный ресурс] – Режим доступа: http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/MMoB/10.pdf
39. Воробьев, А. А. Полимеразная цепная реакция и ее применение для диагностики в дерматовенерологии: учебник / А. А. Воробьев - Медицинское информационное агентство, 2004. – 72 с.
40. Детекция результатов ПЦР [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://www.dna-technology.ru/files/images/metodichki/OsnoviPCR.pdf>
41. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. - Изд. 3-е - Москва : Медицина. - 2007. – 700 с.
42. Pingoud, A. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism / A. Pingoud [et al] // Cellular and molecular life sciences. – 2005. - V. 62. - №. 6. - P. 685-707.
43. Чмуж, Е. В. Новая эндонуклеаза рестрикции BslI из *Bacillus subtilis* ТЗО узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G (m5C)>


- l'NGC-3' / Е. В. Чмуж [и др.] // Биотехнология. – 2005. - № 3. – С. 22 – 26.
44. Рестриктазы [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://studfiles.net/preview/4597142/>
 45. Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз [электронный ресурс] – режим доступа: http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_2.htm
 46. Пунина, Н. В. Изучение генетического разнообразия *Bacillus thuringiensis*, выделенных в различных эколого-географических зонах Украины, при помощи анализа генов 16S рРНК / Н. В. Пунина, В. С. Зотов, А. Л. Пархоменко // Acta Naturae (русскаяязычная версия). – 2013. Т. 5, № 1. – С. 93–103.
 47. Кузьмина, Н. Раздел : Генная инженерия: построение карт рестрикции [Электронный ресурс] / Биотехнология – Режим доступа http://www.biotechnolog.ru/ge/ge4_1.htm
 48. Oller, A. R. Ability of DNA and spermidine to affect the activity of restriction endonucleases from several bacterial species / A. R. Oller [et al] // Biochemistry. – 1991. – V. 30. – Is. 9. – P. 2543-2549.
 49. Классификация рестриктаз [Электронный ресурс] - Режим доступа: https://studopedia.su/8_1987_restriktazi.html
 50. Slaymaker, I. M. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity / I. M. Slaymaker [et al] // Science. – 2016. –V. 351. – P. 84-88.
 51. Чернухин, В. А. Сравнительный рестрикционный анализ хромосомной днк крысы in vitro и in silico / В. А. Чернухин [и др.] // Вестник биотехнологии, 2006. – Т. 2. - №. 3. – С. 39.
 52. Белова, Е. Г. Герпесвирусы 6, 7, 8-го типов / Е. Г Белова, Т. К. Кускова // Лечащий врач. – 2006. – Т. 2. - С. 76 – 79.
 53. Кравец, А. П. Изменения профиля метилирования ДНК растений пшеницы при хроническом γ облучении семян / А. П. Кравец [и др.] // Цитология и генетика. - 2010. - №. 5. – С. 18 – 22.

54. Зернов, Ю. П. Использование рестрикционного анализа амплифицированного гена 16S РНК для идентификации микроорганизмов на примере бактериальных продуцентов термоллабильной щелочной фосфатазы / Ю. П. Зернов, М. Л. Абдурашитов, С. Х. Дегтярев // Биотехнология. – 2005. - №. 6. – С. 3 – 11.
55. Абдурашитов, М. А. Метод рестрикционного анализа геномов млекопитающих *in silico* / М.А. Абдурашитов [и др.] // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова : Москва, 2006. – Т.2. - №. 3. – С. 29 – 39.
56. Сова, В.В. Введение и очистка белков. Методическое пособие по курсу/ В. В. Сова, М. И. Кусайкин // Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. – 42 с.
57. Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рэфф – Москва: Мир, 1994. – Т. 1. – 517 с.
58. Pingoud, A. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism / A. Pingoud [et al] // Cellular and molecular life sciences. – 2005. – V. 62. – №. 6. – P. 685-707.
59. Поляничко, А. М. Электрофорез в агарозном геле: учебно-методическое пособие / А. М. Поляничко – Москва : Наука, 2007. – 157 с.
60. Гусейнов, О.А. Методы биохимических исследований: учеб.-метод. пособие к лаб. занятиям / О. А. Гусейнов. - Красноярск: СФУ, 2011. – 48 с.
61. Короткевич, О.С. Молекулярная биология: методические разработки по выполнению лабораторных работ / О.С. Короткевич, О. И. Себежко, М. П. Люханов. – Новосибирск: НГАУ, 2017. – С.19.
62. Гааль, Э. Электрофорез в разделении биологических макромолекул:учебник / Э. Гааль, Г. Медьеша, Л. Верецкеи // Москва: Мир, 1982 – 447 с.

63. Бромистый этидий [Электронный ресурс] - Режим доступа:
https://memtrick.com/set/krasiteli_9941
64. RFLP Method - Restriction Fragment Length Polymorphism [электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/RFLP.html>
65. Guseynov, O. Effects of ionizing radiation on marine bacteria / O. Guseynov [et al] // Luminescence, - 2014 - V.29. - N1. - p. 57-58.
66. Негенетические методы идентификации микроорганизмов [Электронный ресурс] - Режим доступа: https://studref.com/403094/tovarovedenie/identifikatsiya_mikroorganizmov
67. Идентификация микроорганизмов [Электронный ресурс] - Режим доступа: <https://studfiles.net/preview/3882817/page:17/>
68. Выделение ДНК [электронный ресурс] – Режим доступа http://medprom.ru/medprom/mpp_0000367.
69. Vogelstein, B. Preparative and analytical purification of DNA from agarose / B. Vogelstein, D. Gillespie // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 1979. V. 76, I 2. - P. 615-619.
70. Hartung, T. Food for Thought ... on In Silico Methods in Toxicology [Электронный ресурс] / T. Hartung, S. Hoffmann, J. Hopkins. – Baltimore: UB, 2009. – Режим доступа: http://www.altex.ch/resources/FFT_3_09.PDF
71. GenBank [Электронный ресурс] : база данных – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Кафедра медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ

 Заведующий кафедрой
Е. И. Шишацкая

« 6 » июня 2019 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

Применение метода анализа ПДРФ при выявлении разных видов
рода *Bacillus*

Научный руководитель



доцент, к.б.н.

О. А. Гусейнов

Выпускник



С.В. Тонких

Красноярск 2019